

**DOSIS-WIRKUNGSBEZIEHUNG VON
ANTILYMPHOZYTENSERUM (ALS) IN BEZUG AUF
RATTENHAUTTRANSPLANTATE
UND DER VERSUCH EINER VERBESSERUNG DES
IMMUNSUPPRESSIVEN EFFEKTES DURCH
ZUSÄTZLICHE VORBEHANDLUNG MIT
ERYTHROZYTEN**

Oliver Schnackenburg
—

1980
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549007_0009

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. Dr.h.c. W. Brendel)

DOSIS-WIRKUNGSBEZIEHUNG VON
ANTILYMPHOZYTENSERUM (ALS) IN BEZUG AUF RATTEN-
HAUTTRANSPLANTATE UND DER VERSUCH EINER VERBESSERUNG
DES IMMUNSUPPRESSIVEN EFFEKTES DURCH ZUSÄTZLICHE
VORBEHANDLUNG MIT ERYTHROZYTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Oliver Schnackenburg
aus Immenstadt

München 1980

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. J. Seifert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr.h.c. W. Brendel

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10. 80



Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ALS	=	Antilymphozytenserum
PGG	=	Pferdegammaglobulin
SD	=	Solu-Decortin ^R
$\bar{x}$	=	Mittelwert
$\bar{s}_x$	=	mittlerer Fehler des Mittelwertes (Standardabweichung $\sqrt{n}$)

INHALTSANGABE

	Seite
1. Einleitung	1
2. Ziel der Arbeit	6
3. Material und Methodik	9
3.1. Versuchstiere	9
3.2. Herstellung von Antilymphozytenserum	9
3.2.1. Gewinnung	9
3.2.2. Absorption	10
3.3. Herstellung der Erythrozytensuspension	11
3.4. Tierversuche	12
3.4.1. Technik der Hauttransplantation	12
3.4.2. Kriterien der Abstoßung	
3.4.3. Versuchsanordnung	15
3.4.3.1. Dosis-Wirkungskurve	15
3.4.3.2. Versuche zur Senkung der Mortalitätsrate	16
3.4.3.3. Vorbehandlung mit Vollblut	17
3.4.3.4. Vorbehandlung mit Erythrozyten	19
3.4.3.5. Umkehr des Spender Empfängersystems	20
3.5. Serologische Untersuchungen	22
3.5.1. Präzipitierende Antikörper	22
3.5.2. Aktiver Hämagglutinationstest	23
3.6. Sonstige verwendete Materialien	24

	Seite
4.	Ergebnisse 25
4.1.	Dosis-Wirkungskurve von ALS 28
4.2.	Versuch zur besseren Verträglichkeit 32
	hoher ALS-Dosierungen durch Kortikosteroide
4.3.	Versuche zur Transplantatverlängerung 34
	durch Vorbehandlung mit Vollblut und ALS
4.4.	Transplantatverlängerung durch Vorbehand- 39
	lung mit Erythrozyten und ALS
4.5.	Umkehr des Spender-Empfängersystems 44
4.6.	Ergebnisse der Serumuntersuchungen 47
4.6.1.	Nachweis präzipitierender Antikörper 47
4.6.2.	Nachweis hämagglutinierender Antikörper 48
5.	Diskussion 51
6.	Zusammenfassung 78
7.	Literaturverzeichnis 80

1. Einleitung

Den Versuch, das Abwehrsystem eines lebenden Organismus zu beeinflussen, gibt es solange versucht wird, Krankheiten zu behandeln. Er kann bis ins Ende des letzten Jahrhunderts zurückverfolgt werden. (59) Seitdem wurde immer wieder versucht, durch Medikamente oder Antiseren gezielt gegen immunologisch-kompetente Zellsysteme vorzugehen. (23)) Normalerweise haben diese Zellsysteme lebenserhaltende Funktion wie die der Infektabwehr oder der Tumorbekämpfung. Doch die Antikörperbildung kann auch pathologisch verändert sein und zu Autoimmunkrankheiten, Allergien oder Antikörpermangelsyndromen führen. (35) Wenn bei der Infektabwehr eine Stärkung der geschwächten immunologischen Abwehrlage erwünscht ist, so gilt es bei der Organtransplantation eine Immunsuppression zu erzielen.

LEXER und SCHÖNE (71) gehören zu den ersten, die auf das unterschiedliche Verhalten von Auto- und Homotransplantaten und deren verschiedenen Abstoßungszeiten hinwiesen. Aus diesen Erkenntnissen prägte SCHÖNE schon 1912 den Begriff der Transplantationsimmunität.

Die gegenwärtigen Erfolge bei der Verlängerung von transplantierten Organen bauen auf die Wirkung von immunsuppressiven Medikamenten auf, die die immunologische Reaktivität unspezifisch herabsetzen. Sie greifen in die Reaktionskette zellulärer Proliferation ein, die im Verlauf von Immunreaktionen stattfinden. Die meisten dieser Mittel haben eine geringe therapeutische Breite und wirken allgemein zytotoxisch, wodurch auch andere Zellsysteme mit hoher Proliferationsrate, z.B. das Knochenmark, geschädigt werden können. Sie verringern die immunologische Abwehr des Empfängerorganismus und erhöhen damit die Infektanfälligkeit und eventuell sogar das Krebsrisiko. (66) Es handelt sich hierbei einmal um chemische Immunsuppressiva wie Nebennierenrindensteroid, alkylierende Verbindungen, Antimetabolite, Methylhydrazinderivate aber auch um die ionisierende Bestrahlung.

Eine weitere Möglichkeit zur Unterdrückung der Transplantatabstoßung ist mit dem Antilymphozytenserum gegeben, welches unter anderem dadurch immunsuppressiv wirkt, daß es einen Teil der immunkompetenten Zellen zerstört. (11) METCHNIKOFF (59)

war 1899 der erste, der antileukozytäre Seren hergestellt hat, die aber sowohl gegen Granulozyten wie auch gegen Lymphozyten gerichtet waren. Aber erst 1964 gelang WOODRUFF und ANDERSON (85) erstmals der Nachweis eines ganz klaren Effektes von ALS im Tierexperiment. Die verpflanzte Haut zweier homologer Rattenstämme überlebte statt 8 Tagen bei den Kontrolltieren bis zu 75 Tagen bei den mit Antilymphozytenserum behandelten Tieren.

Obwohl hier ein immunsuppressives Mittel zur Verfügung steht, das relativ spezifisch in den Immunmechanismus eingreift, gibt es auch hier Probleme in der Anwendung. (68) (14) (49) (15) So wurde im Anfangsstadium der Applikation, bedingt durch Basalmembranantikörper, Glomerulonephritiden verursacht. Auch heute noch treten nach der Applikation von Antilymphozytenserum vereinzelt anaphylaktische Reaktionen gegen das artfremde Eiweiß auf, obwohl die Häufigkeit und die Schwere solcher Reaktionen durch eine vorherige Toleranzinduktion reduziert werden kann. (48) (31) (30) (70)

Die Spezifität des ALS ist jedoch immer noch unzulänglich, da nicht nur Lymphozyten, die für die Abstoßung eines transplantierten Organes verantwortlich sind, zerstört werden, sondern wahrscheinlich auch solche Zellen, die für die allgemeine Infektabwehr nützlich sind. So gibt es klinische und experimentelle Beobachtungen, daß nach Applikation von ALS die Infektionsrate signifikant angestiegen ist. Auch zeigten Patienten, die mit ALS behandelt worden sind, ein erhöhtes Tumorrisiko. (66)

Diese Beobachtungen und Argumente führten dazu, Überlegungen anzustellen, ob es möglich ist, einen transplantatverlängernden Effekt zu erzielen, ohne die allgemeine Abwehr eines Organismus spezifisch oder unspezifisch zu unterdrücken. Dies ist denkbar durch eine Toleranzinduktion gegen ein Fremdantigen (31) (30) (60) (32) (48) oder durch die Erzeugung blockierender Serumfaktoren im Sinne eines Enhancement (79) (39) (57) (27) (55) (56) (19) (44) (61) (17) (80)

Eine immunologische Toleranzinduktion gegen Hauttransplantate gelang BRENT und MEDAWAR (7), dabei wurden fetale Empfängertiere benutzt, bei denen das lymphatische System noch nicht voll ausgebildet war, wodurch eine lebenslange Toleranz erzeugt werden konnte.

Bei erwachsenen Tieren ist das Phänomen der Toleranz nur bei bestimmter Präsentationsform des Antigens z.B. Löslichkeit Dosis, Applikationsart möglich und auch nur bei definierten Antigenen, wie z.B. bovines Serumalbumin oder IgG. (29) (32) (48) (60) Eine andere Möglichkeit einer spezifischen Immunsuppression besteht im Phänomen des Enhancement, wobei es zur Bildung von blockierenden Antikörpern kommt. Diese Antikörper sind in der Lage, das Transplantat vor der Abstoßung zu schützen.

Mit der Immunsuppression durch Antikörper ergibt sich eine bedeutende Möglichkeit in der Transplantationsbiologie. Toleranz und Enhancement

sind wahrscheinlich jedoch nicht getrennt zu betrachtende Phänomene, sondern dürften komplementäre Manifestationsformen immunologischer Reaktionslosigkeit sein. (20) (21) (22)

2. Ziel der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war einmal die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve von Antilymphozytenserum bei einmaliger Anwendung einen Tag nach der Hauttransplantation von Ratten, zum anderen sollten Versuche mit spezifischen immunsuppressiven Mitteln, die zu Toleranz und Enhancement führen, durchgeführt werden.

Wie für jede pharmakologische Substanz, so ist auch für das Antilymphozytenserum zur Beurteilung der optimalen Wirksamkeit eine Dosis-Wirkungsbeziehung notwendig. Nur aus dieser Relation ist eine Beurteilung der Wirksamkeit und der therapeutischen Breite möglich. Für die

weiteren Versuche sollte aus dieser Dosis-Wirkungskurve eine günstige Dosierung gewählt werden.

Da ALS, wie bei jedem anderen Medikament auch, bei Überdosierung unerwünschte Nebenwirkungen, z.B. Herxheimer Reaktion, verminderte Infektabwehr oder eine Thrombopenie verursacht, wurde weiterhin versucht, die Verträglichkeit durch Kortikoide zu verbessern. In der Literatur gibt es Hinweise (4), daß durch Nebennierenrindenhormone im Tierexperiment höhere Dosierungen vertragen werden. Als Anhaltspunkt zur Beurteilung einer verbesserten Verträglichkeit diente die Mortalitätsrate.

Durch weitere Versuche sollte die Wirkung von ALS durch eine zusätzliche Induktion einer Toleranz bzw. Enhancement verbessert werden.

Diese Überlegungen führten zu folgenden konkreten Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden sollten:

- 1) Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve bei einmaliger Gabe von ALS 1 Tag nach der Transplantation
- 2) Versuche zur Senkung der Mortalität bei hohen ALS-Dosierungen mit Hilfe von Solu-Decortin^R
- 3) Vorbehandlung mit Vollblut und anschließende Eliminierung der sensibilisierten Zellen mit Hilfe von ALS
- 4) Versuche zur Erzeugung eines Enhancement-Effektes durch Erythrozytenvorbehandlung

Die Beeinflussung des immunsuppressiven Effektes durch die oben angegebenen Maßnahmen wurde im Rattenmodell an Hand der Überlebenszeit von homologen Hauttransplantaten beurteilt.

3. Material und Methodik

3.1. Versuchstiere

Für die Hauttransplantationen wurden weiße männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 250-300 g verwendet. Diese Tiere wurden von der Fa. Bäumler (Wolfratshausen) bezogen und vor der Transplantation in Sammelkäfigen unter Standardbedingungen gehalten. Als Spendertiere bzw. auch teilweise als Empfängertiere wurden schwarze BD6-Ratten und braune BD9-Ratten verwendet. Diese Tiere stammten aus einer strengen Bruder-Schwester Inzucht aus dem Institut für chirurgische Forschung.

3.2. Herstellung von Antilymphozytenserum

3.2.1. Gewinnung

Zur Gewinnung von ALS stand ein mit 10^9 Rattenthymozyten grundimmunisiertes Pferd (Meteor) zur Verfügung, dessen lymphozytotoxischer Titer über 1:1024 war. Das Immunisierungsmaterial wurde aus Rattenthymi gewonnen, welche unter sterilen Bedingungen entnommen und aufbereitet wurden.

Das gewonnene Serum wurde bei 56° C während 30 Minuten im Wasserbad inaktiviert und anschließend bei -20° C eingefroren.

3.2.2. Absorption

Da alle Seren neben dem erwünschten lymphozytotoxischen Titer auch einen unerwünschten Hämagglutinationstiter hatten, mußte dieser durch Absorption mit Erythrozyten der Empfängerspezies beseitigt werden. Die hierzu benötigten Rattenerythrozyten wurden aus heparinisiertem Rattenblut durch Punktion der Aorta abdominalis an der mit Chloralhydrat (1ml/100 g KG) narkotisierten Ratte gewonnen. Das gewonnene Blut wurde abzentrifugiert und anschließend die Erythrozyten vorsichtig mit Phosphatpufferlösung (pH 7,2) dreimal gewaschen.

Die leukozytenreiche oberste Schicht wurde nach jedem Zentrifugieren zusammen mit dem Überstand abgessaugt, um möglichst eine reine Erythrozytensuspension zu gewinnen. Serum und Erythrozyten wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und für 120 min. bei 37° C inkubiert.

Um eine ausreichende Entfernung der Hämagglutine des ALS zu erreichen, waren in der Regel drei Absorptionsschritte notwendig. Danach hatten die Seren einen Hämagglutinationstiter von 1:2 bis 1:8.

Da bei diesem Absorptionsvorgang erfahrungsgemäß neben dem gegen Erythrozyten auch der gegen Lymphozyten gerichtete zytotoxische Titer sich um einige Stufen vermindern kann, wurde zum Schluß dieser Titer erneut bestimmt und ergab für das ALS einen Titer von 1:1024. Der Proteingehalt betrug 5 g%. Das Serum wurde anschließend bei -20°C bis zur Verwendung eingefroren.

3.3. Herstellung der Erythrozytensuspension

Von BD9-Ratten bzw. Sprague-Dawley-Ratten wurde, um die Erythrozyten nicht zu hämolysieren, unter möglichst langsamer Aspiration Vollblut aus der Aorta abdominalis entnommen. Nach Zentrifugation bei 3000 U/min wurde die oberste Schicht (buffy coat) abgesaugt. Um eine möglichst leukozytenarme Erythrozytensuspension zu bekommen, wurde dieser Waschvorgang und die anschließende Resuspension in Hank'scher Lösung 5x wiederholt.

Die Zählung der Leukozyten mit der Neubauer Zählkammer (50x) ergab vor dem Waschen

bei Sprague-Dawley : $6300/\text{mm}^3$

bei BD9 : $8800/\text{mm}^3$

nach dem fünfmaligen Waschen mit Hank'scher Lösung

bei Sprague-Dawley : $1150/\text{mm}^3$

bei BD9 : $3800/\text{mm}^3$

Das bedeutet, daß die Erythrozytensuspension zwar leukozytenarm, jedoch nicht leukozytenfrei gewesen ist.

3.4. Tierversuche

3.4.1. Hauttransplantation

Bei der Transplantation wurde die Rückenhaut eines Spendertieres übertragen. Dazu wurden die Tiere mit Chloralhydrat (36 mg/100 g KG) narkotisiert und mit einer Haarschneidemaschine ihre Rücken rasiert. Der engere Transplantationsbereich wurde anschließend mit Pilca^R (Fa.Olivia, Wiesbaden) enthaart.

Mit Hilfe einer Stanzzange wurden sowohl bei Spender- als auch Empfängertieren zwei gleichgroße Hautstücke mit einem Durchmesser von etwa 1 cm entnommen. Nachdem das Unterhautfettgewebe abpräpariert war, wurde in die Defekte des Empfängertieres je ein autologes und ein Spenderhautstück eingesetzt und mit Histoacrylkleber (Fa. Braun Melsungen) ringsherum punktförmig angeklebt. Damit die Tiere ihre Transplantate nicht abnagen konnten, wurde über den Transplantatstellen mittels Leukoplaststreifen ein Fliegendrahtgitter befestigt.

Ab dem Zeitpunkt der Transplantation wurden die Ratten unter Normalbedingungen in Einzelkäfigen gehalten und täglich inspiziert.

3.4.2. Kriterien der Abstoßung

Durch die tägliche Inspektion der Transplantate konnte der Abstoßungszeitpunkt bestimmt werden. Dazu wurde eine Farbveränderung und eine palpatologisch feststellbare lederartige Konsistenzveränderung im Vergleich zum Autotransplantat als Abstoßungskriterien gewertet.

Die Hautverfärbungen begannen fleckförmig am Rande oder in der Mitte des Transplantates und breiteten sich dann auf das ganze Transplantat aus. Etwa 4-5 Tage nach dem Auftreten dieser ersten Abstoßungszeichen wurde in der Regel das Transplantat vollständig abgestoßen.

Daß diese subjektiven Abstoßungskriterien mit objektiven Meßmethoden übereinstimmen, wurde in Untersuchungen gezeigt, in denen ein Temperaturabfall von $0,4^{\circ}$ C über dem Transplantat gegenüber dem Autotransplantat zum Zeitpunkt der Abstoßung festgestellt wurde (72). Dieser Temperaturabfall stimmt zeitmäßig mit der Farb- und Konsistenzänderung überein.

Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Abstoßungszeitpunktes ergaben sich durch die mechanische Verletzung des Transplantates, da sich hierbei oft eine Kruste entwickelte, unter der noch ein intaktes Hautstück vorhanden war. Bei der endgültigen Beurteilung einer Abstoßung eines Hauttransplantates wurde eine solche Verletzungsbedingte Krustenbildung berücksichtigt.

3.4.3. Versuchsanordnung

Alle Versuchstiere wurden am Tag 0 transplantiert und erhielten am nächsten Tag (+1) verschiedene Dosierungen von ALS einmalig intravenös in die Schwanzvene appliziert.

3.4.3.1. Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve wurden 9 Gruppen gebildet. Die Empfängertiere waren männliche Sprague-Dawley Ratten. Als Spender-tiere dienten männliche schwarze BD6-Ratten.

Gruppe A1	(n = 5)	unbehandelte Kontrolltiere		
Gruppe A2	(n = 5)	1,0 ml PGG	= 50 mg Protein	
Gruppe A3	(n = 5)	0,1 ml ALS	= 5 mg Protein	
Gruppe A4	(n = 5)	0,25 ml ALS	= 12,5 mg Protein	
Gruppe A5	(n = 5)	0,5 ml ALS	= 25 mg Protein	
Gruppe A6	(n = 5)	1,0 ml ALS	= 50 mg Protein	
Gruppe A7	(n = 5)	1,5 ml ALS	= 75 mg Protein	
Gruppe A8	(n = 5)	2,0 ml ALS	= 100 mg Protein	
Gruppe A9	(n = 3)	2,5 ml ALS	= 125 mg Protein	

Tab.1 Gruppeneinteilung von Sprague-Dawley-Ratten mit BD 6 Hauttransplantaten. Die Tiere erhielten unterschiedliche ALS-Dosierungen i.v. appliziert.

Eine Erhöhung der Dosis über 2,0 ml ALS war mit einer sehr hohen Mortalitätsrate verbunden, so daß auf eine weitere Steigerung der Dosis verzichtet wurde.

3.4.3.2. Um zu prüfen, ob eine Dosiserhöhung von ALS ohne Erhöhung der Mortalitätsrate über die vorher angegebenen Werte möglich ist, wurde den Empfängertieren etwa 2 min vor der ALS-Gabe zusätzlich 1 mg Solu-Decortin gelöst in 0,5 ml aqua dest. i.v. in die Schwanzvene appliziert.

Gruppe B1	(n = 1)	:	3,0 ml ALS
Gruppe B2	(n = 3)	:	2,5 ml ALS
Gruppe B3	(n = 3)	:	2,5 ml ALS + 1 mg SD
Gruppe B4	(n = 3)	:	3,0 ml ALS + 1 mg SD

Tab.2 Dosierungsschema von ALS und Solu-Decortin zur Verbesserung der Verträglichkeit von ALS bei Sprague-Dawley-Ratten.

Bei diesen Tieren wurde nur auf eine Verbesserung der Mortalitätsrate gesichtet und keine Transplantationsversuche durchgeführt. (s.Tab.2)

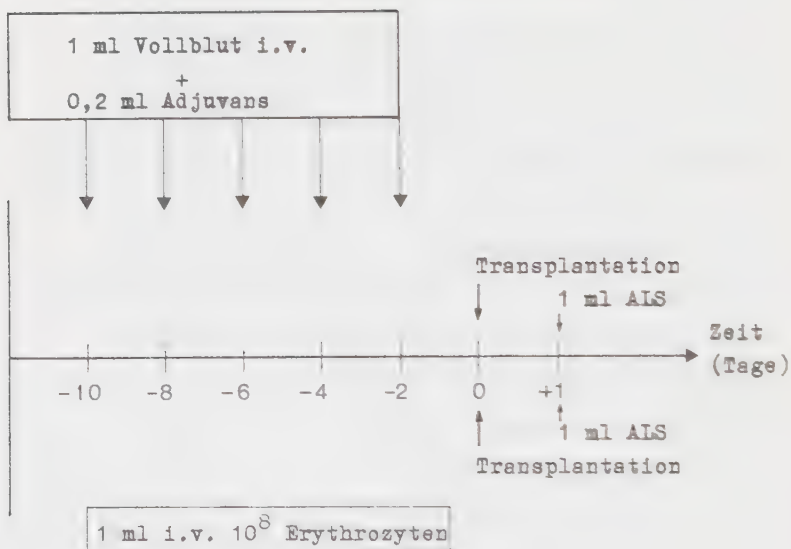
3.4.3.3. Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Versuch, die Abstoßung von Hauttransplantaten dadurch zu beeinflussen, daß die Empfänger-tiere zusätzlich mit Vollblut oder Erythrozyten vorbehandelt wurden, um den ALS-Effekt zu verbessern.

Immunisierung mit Vollblut:

Das Transplantationsmodell wurde dahingehend geändert, daß die Spendertiere braune, männliche BD9-Ratten waren. Die Empfängertiere wurden 10, 8, 6, 4 und 2 Tage vor der Transplantation mit Vollblut und 0,2 ml Adjuvans i.m. vorbehandelt. (s.Abb.1)

Versuchsprotokoll

a. Vollblut



b. 10^8 Erythrozyten

- Abb.1 a) Sprague-Dawley-Ratten erhielten 10, 8, 6, 4, 2 Tage vor der Transplantation mit BD9-Rattenhaut 1 ml BD9-Rattenvollblut i.v. und 0,2 ml Adjuvans i.m.; 1 Tag nach der Transplantation erhielten einige Tiere zusätzlich 1 ml ALS i.v.
- b) Sprague-Dawley-Ratten erhielten 10 Tage vor der BD9-Rattenhauttransplantation 10^8 Erythrozyten von BD9-Ratten und ebenso einige Tiere 1 Tag nach der Hauttransplantation 1 ml ALS i.v.

Gruppe C1	(n = 5)	:	unbehandelte Kontrolltiere
Gruppe C2	(n = 5)	:	1 ml ALS
Gruppe C3	(n = 5)	:	Vollblut + Adjuvans
Gruppe C4	(n = 5)	:	Vollblut + Adjuvans + 1 ml ALS

Tab.4 Sprague-Dawley-Ratten mit Hauttransplantaten
und Vollblut von BD9-Ratten

Das ALS wurde am 1. Tag nach der Transplantation
in einer Dosierung von 1 ml i.v. gegeben.

3.4.3.4. Vorbehandlung mit gewaschenen Erythrozyten:

Die Empfängertiere erhielten 10 Tage vor der Trans-
plantation eine einmalige Gabe von 10^8 gewaschenen
Erythrozyten in einer Menge von 1 ml intravenös in
die Schwanzvene appliziert. (s.Tab.5)

Gruppe D1	(n = 5)	unbehandelte Kontrolltiere
Gruppe D2	(n=5)	1 ml ALS 1 Tag nach der Transplantation
Gruppe D3	(n = 5)	10^8 Erythrozyten
Gruppe D4	(n = 5)	10^8 Erythrozyten + 1 ml ALS 1 Tag nach der Transplantation

Tab.5 Sprague-Dawley-Ratten mit Hauttransplantaten und Erythrozyten von BD9-Ratten.

3.4.3.5. In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Spender-Empfängersystem umgekehrt.

Nun dienten als Empfänger-tiere BD9-Ratten und als Spendertiere Sprague-Dawley Ratten. (s.Tab.6.)

Gruppe E1	(n = 5)	:	unbehandelte Kontrolltiere
Gruppe E2	(n = 5)	:	1 ml ALS
Gruppe E3	(n = 5)	:	10^8 Erythrozyten
Gruppe E4	(n = 5)	:	10^8 Erythrozyten + 1 ml ALS

Tab.6 BD₉-Ratten mit Hauttransplantaten und 10^8 Erythrozyten von Sprague-Dawley-Ratten.

Nach dem Abstoßen der Hauttransplantate wurden die Ratten in Äthernarkose durch Punktion der Bauchsorge entblutet und das Serum für Antikörpernachweise bei -20°C eingefroren.

3.5. Serologische Untersuchungen

3.5.1. Nachweis präzipitierender Antikörper mit dem Agargel Doppeldiffusionstest

Verwendet wurde die Mikromethode nach OUCHTERLONY (65). Dazu wurden unbeschichtete Objektträger mit CrSO_4 gereinigt, beschriftet, mit einer 2 %igen Agarlösung dünn bestrichen und anschließend für einige Minuten in den heißen Trockenschrank gelegt. Anschließend wurde die eigentliche Trägersubstanz von 1,5 %iger Agarlösung mittels einer Pipette mit 2,5 ml pro Objektträger aufgetragen.

Zur Herstellung der 2 %igen Agarlösung wurde von 0,2 g Agar (Fa. Behring) Nr. 9253 in 10 ml Agarose Puffer (Diäthylbarbitursäurenatriumssalz 24,74 g Calciumlactat 1,54 g und Natriumazid 0,2 g) aufgekocht.

Entsprechend wurde die 1,5 %ige Agarlösung hergestellt.

Die gelösten Antikörper bzw. das Antigen wurde in vorher eingestanzte Löcher eingefüllt. Durch Diffusion der beiden Stoffe entstanden bei einer AG/AK Reaktion beurteilbare Präzipitationslinien nach ca. 24 bis 72 Stunden. Die Präparate wurden anschließend mit physiologischer Kochsalzlösung gewässert und mit Amidoschwarzlösung (1 g Amidoschwarz, 6,12 g Na-Azetat x 3 H₂/, 2,6 ml Eisessig, 100 ml Glycerin) gefärbt.

3.5.2. Aktiver Hämagglutinationstest

Als Antigen dienten frisch gewonnene Rattenerythrozyten, die 3 x in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen wurden. Von den zu untersuchenden Seren wurden Verdünnungsreihen hergestellt. (1:2, 1:4, 1:8, etc.)

In Röhrchen wurden je 0,1 ml einer 1 %igen Lösung der gewaschenen Erythrozyten zu der Serumverdünnung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37° wurden die Proben abgekühlt und bei 4° C 30 min. gelagert. Nach vorsichtigem Aufschütteln

der Teströhrchen wurde je ein Tropfen auf einen Objektträger pipettiert und das Ergebnis mikroskopisch abgelesen.

3.6. Sonstige verwendete Materialien

Für Kontrollexperimente im Zusammenhang mit der Dosis-Wirkungskurve wurde Gammaglobulin vom Pferd mit einer Eiweißkonzentration von 50 mg verwendet. (Fa. Behringwerke Marburg).

Die Versuche zur Senkung der Mortalität bei hoher einmaliger Gabe von ALS wurden mit Solu-Decortin (Fa. Merck) durchgeführt. Dazu wurden 1 mg S.D. in 0,5 ml aqua dest. aufgelöst.

Um eine verstärkte Immunantwort zu erhalten, wurde bei den Versuchen von Vorbehandlung durch Vollblut zusätzlich das Adjuvans "Serum-Aktivator" von der Firma Vitorgan Arzneimittelfabrik Dr. Theurer K.G. verwendet. Es handelt sich hierbei um eine kolloidale Komplexverbindung aus Aluminiumhydroxid und Kieselsäure mit einem Zusatz von Phenol.

4. Ergebnisse

4.1. Versuche zur Erlangung einer Dosis-Wirkungs-
beziehung von ALS in Bezug auf die Verlängerung
von Hauttransplantaten bei einmaliger Gabe 1 Tag
nach der Transplantation.

Wie bei jeder für die Immunsuppression eingesetz-
ten Substanz muß auch für ALS eine dosisabhängige
Transplantatverlängerung nachweisbar sein.

Wie Tab. 7 zeigt, wurden die Ergebnisse bezüglich
der Transplantatverlängerung von ALS behandelten
Tieren völlig unbehandelten und mit Normal PGG
behandelten Tieren gegenübergestellt.

Gruppen		Behandlung	$\bar{x}$	$\bar{s}_x$
Gruppe A1	(n = 5)	unbehandelte Kontrolltiere	12,40 $\pm$ 0,22	Tage
Gruppe A2	(n = 5)	1,0 ml PGG = 50 mg Protein	14,25 $\pm$ 0,22	Tage
Gruppe A3	(n = 5)	0,1 ml ALS = 5 mg Protein	15,20 $\pm$ 0,49	Tage
Gruppe A4	(n = 5)	0,25 ml ALS = 12,5 mg Protein	16,20 $\pm$ 0,37	Tage
Gruppe A5	(n = 5)	0,50 ml ALS = 25 mg Protein	18,20 $\pm$ 0,49	Tage
Gruppe A6	(n = 5)	1,0 ml ALS = 50 mg Protein	19,20 $\pm$ 0,37	Tage
Gruppe A7	(n = 5)	1,5 ml ALS = 75 mg Protein	19,40 $\pm$ 0,51	Tage
Gruppe A8	(n = 5)	2,0 ml ALS = 100 mg Protein	19,80 $\pm$ 0,37	Tage
Gruppe A9	(n = 1)	2,5 ml ALS = 125 mg Protein	21,0 $\pm$ 0	Tage

Tab.7 Überlebenszeiten von BD6-Hauttransplantaten bei Sprague-Dawley-Ratten. Behandelte Empfängertiere erhielten unterschiedliche ALS-Dosierungen 1 Tag nach der Transplantation.

Die unbehandelten Tiere erreichten eine mittlere Überlebenszeit von $12,40 \pm 0,22$ Tage, während die mit 1 ml Pferde GG schon einen transplantatverlängernden Effekt um durchschnittlich 2 Tage aufwiesen.

Die Behandlung mit Antilymphozytenserum begann mit einer Dosierung von 0,1 ml, womit die Transplantate eine Überlebenszeit von 15,20 Tagen $\pm 0,49$ hatten. Die Dosissteigerung auf 0,25 ml ergab eine Verbesserung um einen Tag. Die Wirkung erhöhte sich fast linear weiter bei einer Dosis von 0,5 ml ALS auf $18,20 \pm 0,49$ Tagen und bei einer Dosis von 1,0 ml auf $19,20 \pm 0,37$ Tagen. Bei einer weiteren Erhöhung auf 1,5 ml ALS ließ die Wirkungssteigerung etwas nach und bei 2,0 ml betrug die mittlere Überlebenszeit $19,80 \pm 0,37$ Tage.

Obwohl die Dosis bei den letzten Experimenten vervierfacht worden ist, ist der transplantatverlängernde Effekt nur um 1,6 Tage verbessert worden.

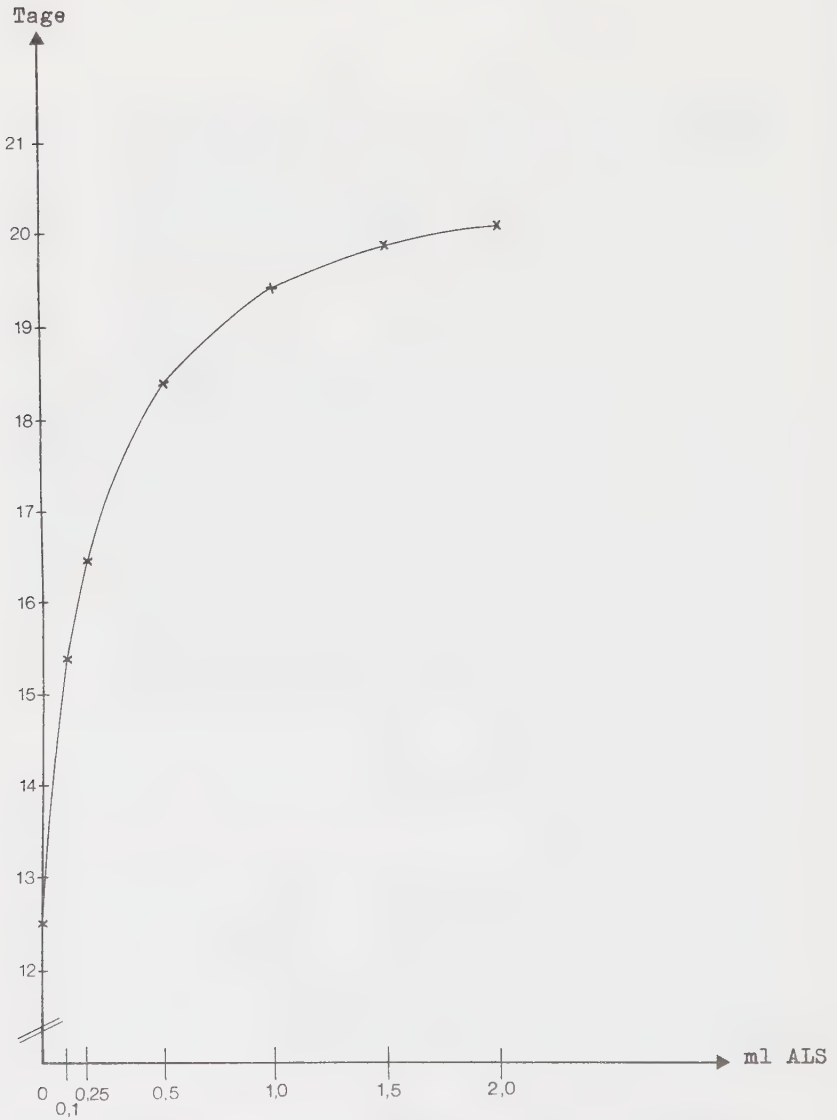


Abb.2 Dosis-Wirkungskurve von ALS bei Sprague-Dawley-Ratten mit Hauttransplantaten von BD6-Ratten.



Abb.3 Überlebenszeiten von BD6 Rattenhauttransplantaten bei Sprague-Dawley-Ratten. ALS-Gabe 1 x 1 Tag nach Transplantation

- A1: unbehandelte Kontrollgruppe
- A2: Kontrollgruppe mit 1 ml PGG
- A3: 0,1 ml ALS
- A4: 0,25 ml ALS
- A5: 0,5 ml ALS
- A6: 1,0 ml ALS
- A7: 1,5 ml ALS
- A8: 2,0 ml ALS

Bei den Dosierungen von 1,5 ml ALS und 2,0 ml ALS zeigten sich Unverträglichkeitsreaktionen wie kurzzeitiger Atemstillstand oder Herzstillstand. Durch Sauerstoffgabe und externer Herzmassage erholten sich die Tiere jedoch sehr rasch.

Bei der Gabe von 2,5 ml ALS (s.Tab.8) starben von 5 Versuchstieren 2 Tiere sofort während der i.v. Applikation und 2 weitere Tiere bis zum nächsten Tag. 1 Ratte überlebte und erreichte eine Transplantatüberlebenszeit von 21 Tagen.

Gruppe	Anzahl der Tiere	Applikation	Überlebende
A1	(n = 5)	unbehandelte Kontrolle	5
A2	(n = 5)	1,0 ml PGG = 50 mg Protein	5
A3	(n = 5)	0,1 ml ALS = 5 mg Protein	5
A4	(n = 5)	0,25 ml ALS = 12,5 mg Protein	5
A5	(n = 5)	0,5 ml ALS = 25 mg Protein	5
A6	(n = 5)	1,0 ml ALS = 50 mg Protein	5
A7	(n = 5)	1,5 ml ALS = 75 mg Protein	5
A8	(n = 5)	2,0 ml ALS = 100 mg Protein	5
A9	(n = 3)	2,5 ml ALS = 125 mg Protein	1

Tab.8 Mortalitätsrate von Sprague-Dawley-Ratten
bei steigender ALS-Dosierung.

4.2. Eine Verbesserung der Verträglichkeit von ALS sollte mit Kortikosteroiden erreicht werden.

Das verwendete Solu-Decortin^R wurde in einer Dosierung von 1 mg in 0,5 ml aqua dest. etwa 2 min vor der Applikation von ALS langsam intravenös in die Schwanzvene gespritzt.

Dazu wurden 4 Gruppen gebildet. In der 1. Kontrollgruppe erhielt 1 Ratte 3 ml ALS. Das Versuchstier starb kurz nach der ALS-Gabe. Die 2. Kontrollgruppe bestand aus 3 Tieren, die jeweils 2,5 ml ALS appliziert bekamen und mit dieser Dosierung alle überlebten.

Die 3. Gruppe wurde mit Ratten gebildet, die 1 mg S.D. und 2,5 ml ALS erhielten. Von 3 Tieren starben 2 Tiere. In der 4. Gruppe wurde die Dosierung auf 3,0 ml ALS erhöht + 1 mg S.D. Auch mit dieser Dosierung überlebten von 3 Ratten nur 1 Ratte.

Gruppe B1	(n = 1)	3,0 ml ALS	- Überlebende
Gruppe B2	(n = 3)	2,5 ml ALS	3 Überlebende
Gruppe B3	(n = 3)	2,5 ml ALS + 1 mg SD	1 Überlebende
Gruppe B4	(n = 3)	3,0 ml ALS + 1 mg SD	1 Überlebende

Tab.9 Mortalitätsrate von Sprague-Dawley-Ratten bei hohen ALS-Dosierungen und zusätzlicher Applikation von Kortikosteroiden.

Es gelang also keine Senkung der Mortalität durch zusätzliche Gabe von Solu-Decortin.

Die Tiere starben an Atemstillstand bzw. Herzstillstand.

Aus den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche (s.Abb.2) ergibt sich eine günstige Dosis-Wirkungsrelation bei 1 ml ALS. Diese Dosierung zeigt eine Wirkung von etwa 80 % der Maximalwirkung und wird von den Ratten noch gut toleriert.

Da eine Dosissteigerung über 1 ml hinaus in diesem Modell nur noch einen geringen transplantatverlängernden Effekt erbringt, ist eine Erhöhung der Dosis auch nicht sinnvoll.

4.3. Prüfung der Transplantatverlängerung durch Vorbehandlung mit Vollblut

Beobachtungen, daß Nierentransplantatempfänger eine bessere Transplantatüberlebenszeit haben, wenn sie vorher mehrere Blutkonserven erhalten hatten, führten zu der Vermutung, daß durch die Vorbehandlung möglicherweise schützende Antikörper gebildet worden sind (63)(67).

In dieser Versuchsreihe sollte durch die Vorbehandlung mit Spenderblut ein transplantatverlängernder Effekt erzielt werden.

Dazu wurden Sprague-Dawley Ratten mit Vollblut von BD9-Ratten und zur Verstärkung der Immunantwort mit dem Adjuvans "Serum-Aktivator" sensibilisiert und das Ergebnis wiederum an Hauttransplantaten abgelesen.

Sprague-Dawley Ratten erhielten 10 Tage lang alle 2 Tage je 1 ml Vollblut i.v. in die Schwanzvene von den Spendertiere BD9-Ratten und 0,2 ml Adjuvans i.m. appliziert (s.Tab.3).

Das Ergebnis zeigt Abb.4 und Tab.10. Die behandelten Versuchstiere erreichten eine durchschnittliche Transplantatüberlebenszeit von $15,4 \pm 0,55$ Tagen gegenüber $14,4 \pm 0,24$ Tagen bei unbehandelten Kontrolltieren.

Durch die alleinige Vorbehandlung mit Vollblut gelang somit nur eine geringe Transplantatverlängerung von 1 Tag.

Aufgrund der Vermutung, daß mit der Vorbehandlung von Vollblut allein in diesem Versuchsmodell keine oder zumindest nur eine geringe Transplantatverlängerung erzielt werden kann, sollte durch die zusätzliche Applikation von ALS nach der Hauttransplantation versucht werden, die gebildeten sensibilisierten Lymphozyten zu eliminieren und

dadurch eine stärkere Verlängerung von Hauttransplantaten zu erreichen.

Dazu wurde das gleiche Versuchsmodell verwendet. Zusätzlich bekamen die Tiere einen Tag nach der Transplantation 1 ml ALS i.v. in die Schwanzvene appliziert.

Aus der Abb.4 und Tab.10 ist ersichtlich, daß auch durch diese Maßnahmen die mittlere Überlebenszeit der Hauttransplantate nicht verbessert werden konnte.

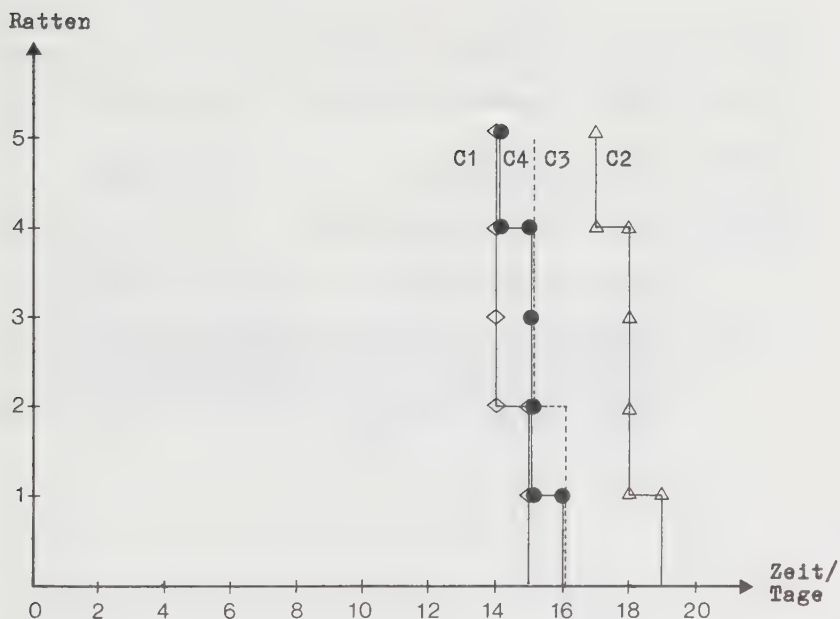


Abb.4 Überlebenszeiten von BD9 Hauttransplantaten bei Sprague-Dawley-Ratten. Behandelte Empfängertiere erhielten 10 Tage lang alle 2 Tage je 1 ml Vollblut i.v. und 0,2 ml Adjuvans i.m. an den Tagen -10, -8, -6, -4, -2. Gruppe 4 erhielt zusätzlich am Tag +1 1 ml ALS i.v.

Gruppen		Behandlung	$\bar{x}$ $\bar{s}_x$
Gruppe C1	(n=5)	unbehandelte Kontrollgruppe	14,4 $\pm$ 0,24 Tage
Gruppe C2	(n=5)	1 ml ALS	18,0 $\pm$ 0,32 Tage
Gruppe C3	(n=5)	Vollblut + Adjuvans	15,4 $\pm$ 0,55 Tage
Gruppe C4	(n=5)	Vollblut + Adjuvans + 1 ml ALS	15,0 $\pm$ 0,22 Tage

Tab.10 Überlebenszeiten von BD9-Hauttransplantaten bei Sprague-Dawley-Ratten. Behandelte Tiere erhielten 10 Tage vor der Hauttransplantation alle 2 Tage 1 ml BD9-Rattenvollblut i.v. und 0,2 ml Adjuvans i.m.

Eine deutliche Verkürzung der Transplantatüberlebenszeit ist in der mit ALS behandelten Gruppe

C₄ durch die Vorbehandlung mit Vollblut festzustellen.

Unter diesen Versuchsbedingungen gelang somit durch die Vorbehandlung mit Vollblut keine Verlängerung der Überlebenszeit von Rattenhauttransplantaten.

4.4. Prüfung der Transplantatverlängerung durch Vorbehandlung mit gewaschenen Erythrozyten

In diesem Versuch sollten die Ratten anstelle von Vollblut mit gewaschenen Erythrozyten vorbehandelt werden, da damit eine bessere Transplantatverlängerung in der Literatur beschrieben worden ist.

Dadurch sollte der Anteil an schützenden Antikörpern erhöht werden. Wiederum dienten Sprague-Dawley Ratten als Empfängertiere, die mit gewaschenen Erythrozyten von BD9-Ratten 10 Tage vor der Hauttransplantation in einmaliger Gabe von 10^8 Erythrozyten vorbehandelt wurden (s.Tab.3).

Gruppen		Behandlung	$\bar{x}$	$\bar{s}_x$
Gruppe D1	(n = 5)	unbehandelte Kontrolle	14,40 $\pm$ 0,24	Tage
Gruppe D2	(n = 5)	1 ml ALS	18,0 $\pm$ 0,32	Tage
Gruppe D3	(n = 5)	10 ⁸ Erythrozyten	19,40 $\pm$ 0,51	Tage
Gruppe D4	(n = 5)	10 ⁸ Erythrozyten + 1 ml ALS	22,80 $\pm$ 0,80	Tage

Tab.11 Überlebenszeiten von BD9-Hauttransplantaten bei Sprague-Dawley-Ratten. Behandelte Tiere erhielten 10 Tage vor der Transplantation 10⁸ Spendererythrozyten.

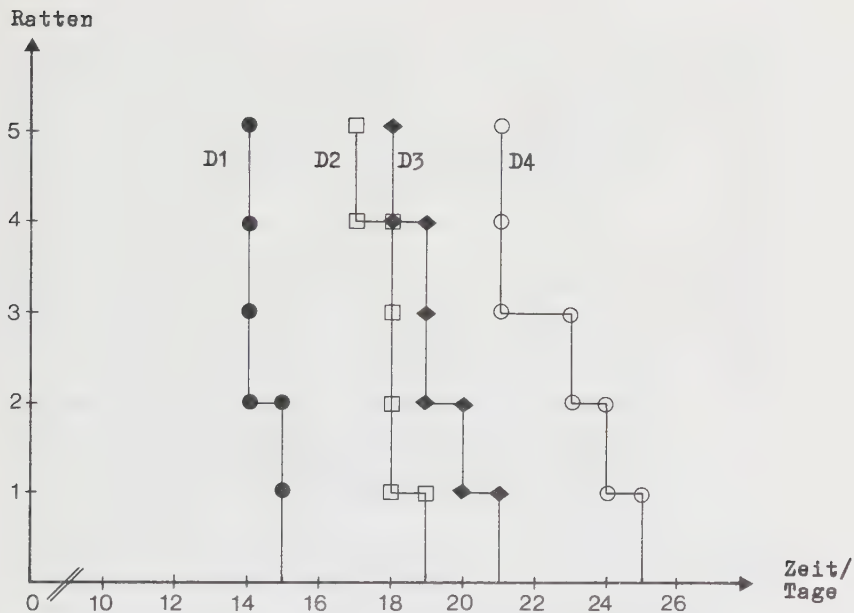


Abb.5 Überlebenszeiten von BD9 Hauttransplantaten bei Sprague-Dawley-Ratten als Stufenkurve dargestellt. Behandelte Empfängertiere erhielten 10 Tage vor der Transplantation 10^8 Spendererythrozyten.

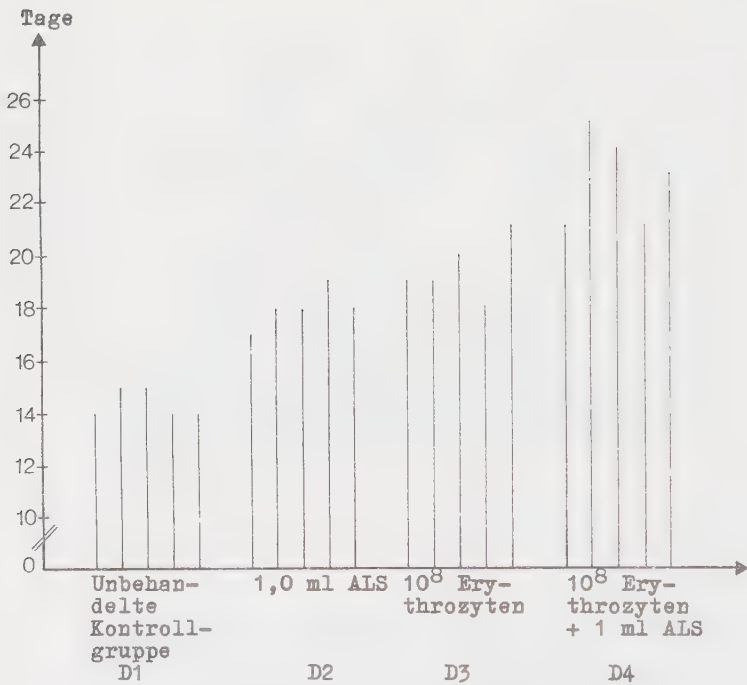


Abb.6 Überlebenszeiten von BD9 Rattenhauttransplantaten bei Sprague-Dawley-Ratten, die mit 10^8 Erythrozyten vorbehandelt wurden.

In der Gruppe D 2, bei der die Tiere nur 1 ml ALS erhielten, ist der transplantatverlängernde Effekt mit $18,00 \pm 0,32$ Tagen um einen Tag geringer als bei gleichen Versuchsbedingungen mit BD6-Ratten.

Werden nun wie in den Gruppen D 3 und D 4 die Empfängertiere am 10. Tag vor der Transplantation 1 x mit einer Injektion von 10^8 gewaschenen Erythrozyten in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung vorbehandelt und bekommen die Versuchstiere wie in der Gruppe D 4 zusätzlich 1 ml ALS am Tag + 1 appliziert, so zeigt sich ein ganz deutlicher transplantatverlängernder Effekt.

In der Gruppe D 3 wurde eine mittlere Transplantatüberlebenszeit von $19,4 \pm 0,51$ Tage ermittelt und damit ist diese Zeit um 5 Tage gegenüber der Kontrollgruppe verlängert. Durch die zusätzliche Gabe von ALS ist eine nochmalige Steigerung der Transplantatüberlebenszeit auf $22,8 \pm 0,80$ Tage zu erzielen (s. Abb. 5 und 6).

4.5. Umkehrung des Empfänger-Spendersystems

Interessant ist in dem Zusammenhang, ob die vorangegangenen Ergebnisse als aktives Enhancement zu interpretieren sind. Deswegen sollte in dieser Versuchsanordnung untersucht werden, ob durch die Umkehrung des Spender-Empfängersystems ebenfalls ein transplantatverlängernder Effekt erreicht werden kann.

Die Hauttransplantate wurden nun von Sprague-Dawley Ratten gewonnen und auf BD9-Ratten transplantiert. Die Versuchstiere erhielten wie in den vorangegangenen Versuchen 10 Tage vor der Transplantation eine einmalige Gabe von 10^8 gewaschenen Erythrozyten.

Gruppen	Behandlung	$\bar{x}$	$\bar{s}_x$
Gruppe E 1 (n=5)	unbehandelte Kontrolltiere	12,80 $\pm$ 0,30 Tage	
Gruppe E 2 (n=5)	1 ml ALS	16,80 $\pm$ 0,30 Tage	
Gruppe E 3 (n=5)	10 ⁸ Erythrozyten	14,40 $\pm$ 0,22 Tage	
Gruppe E 4 (n=5)	10 ⁸ Erythrozyten + 1 ml ALS	16,60 $\pm$ 0,22 Tage	

Tab.12 Überlebenszeiten von Sprague-Dawley-Ratten-hauttransplantaten bei BD9-Ratten. Behandelte Empfänger-tiere erhielten 10 Tage vor der Transplantation 10⁸ Spender-erythrozyten.i.v.

Wie die Abb.7 zeigt, ergab sich für die Gruppe, die nur mit Erythrozyten vorbehandelt wurde, eine mittlere Transplantatüberlebenszeit von 14,4 $\pm$ 0,22 Tagen.

Die Gruppe, die zusätzlich am Tag +1 1 ml ALS erhielt, hatte eine mittlere Überlebenszeit von 16,6 $\pm$ 0,22 Tagen.

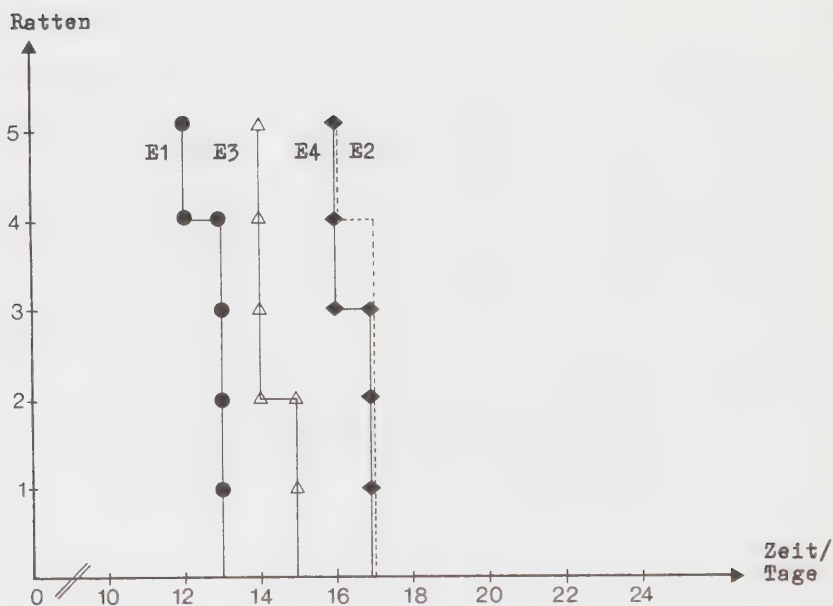


Abb.7 Überlebenszeiten von Sprague-Dawley-Ratten-hauttransplantaten bei BD9-Ratten

Diese Ergebnisse zeigen, daß bei Umkehr des Spender-Empfängersystems der transplantatverlängernde Effekt vermindert wird.

4.6. Ergebnisse der Serumuntersuchungen

4.6.1. Nachweis präzipitierender Antikörper

Untersucht wurden die Seren von Sprague-Dawley Ratten, die mit unterschiedlichen Dosierungen von ALS behandelt wurden und Hauttransplantate von schwarzen BD6-Ratten erhielten. Zusätzlich wurden die Seren von Sprague-Dawley Ratten untersucht, die braune Haut von BD9-Ratten erhielten und mit Erythrozyten vorbehandelt wurden.

Alle Tiere wurden nach dem vollständigen Abstoßen der Hauttransplantate entblutet und die Seren für die Antikörpernachweise verwendet.

Dabei zeigte sich in allen Versuchen, daß bei keinem Tier Präzipitationslinien im Ouchterlony Test gegen Pferde GG gefunden wurde.

Präzipitierende Antikörper wurden jedoch an allen Fällen gegen Seren von braunen BD9-Ratten, schwarzen BD6-Ratten und gegen weiße Sprague-Dawley Ratten gefunden. Diese Antikörper gegen das Eiweiß der

Spendertiere wurde sowohl bei einer frühen Abstoßung als auch bei einer Transplantatverlängerung beobachtet. Daraus läßt sich nicht schließen, ob es sich um Antikörper handelt, die das Transplantat schützen oder zerstören.

4.6.2. Nachweis von Hämagglutinationstitern gegen braune BD9-Ratten und gegen schwarze BD6-Ratten-erythrozyten

Die unterschiedliche Antikörperbildung zeigt Tab.13. Mit dieser Untersuchung sollte geprüft werden, ob bei weißen Sprague-Dawley Ratten, die mit Erythrozyten von braunen BD9-Ratten vorbehandelt wurden und die Haut von BD9-Ratten erhalten hatten, eine geringere Antikörperbildung im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren nachzuweisen ist.

Die Einteilung erfolgte in 4 Gruppen, wobei die Gruppe F1 der unbehandelten Kontrollgruppe entspricht, die Gruppe F2 nur aus Tieren bestand, die 1 ml ALS erhielten, Gruppe F3 nur 10^8 Erythrozyten

und Gruppe F4 10^8 Erythrozyten und 1 ml ALS appliziert wurde.

Die geringste Antikörperbildung zeigen ganz deutlich die Gruppen F3 und F4.

Aus diesem Ergebnis kann vermutet werden, daß durch die Erythrozytenvorbehandlung vermehrt schützende bzw. blockierende Antikörper gebildet wurden und somit zu einer geringeren Antikörperbildung gegen Spendererythrozyten geführt haben.

Spendererythrozyten	Gruppen			
	F1	F2	F3	F4
BD9 – Ratten – erythrozyten	1 : 64	1 : 128	o	o
	o	1 : 128	1 : 2	1 : 4
	1 : 8	1 : 8	1 : 2	–
	1 : 32	1 : 8	1 : 2	1 : 2
	–	–	–	o
BD6 – Ratten – erythrozyten	1 : 8	1 : 256	o	o
	o	1 : 256	o	o
	1 : 2	1 : 2	o	o
	1 : 8	1 : 2	o	o
	–		o	o

Tab.13 Hämagglutinationstiter gegen Spendererythrozyten bei Sprague-Dawley-Ratten.

5. Diskussion

In der klinischen Transplantationschirurgie ist die Transplantation der Niere abgesehen von der Haut am frühesten versucht worden (42)(82) und in ihren Erfolgen heute am weitesten fortgeschritten.

Ausschlaggebend dafür ist wohl die ansteigende Zahl von Patienten, die jährlich an terminaler Urämie sterben, in Deutschland zur Zeit jährlich ca. 10 000 Menschen, und weiterhin die Problemlosigkeit bei der Operationstechnik.

Zwar steht heute die Hämodialyse zur Verfügung, jedoch gibt es weiterhin absolute Indikationen zur Transplantation wie Progredienz der urämischen Komplikationen Hochdruck und Nebenwirkungen wie Osteopathie und Polyneuritis.

Während die chirurgische Technik der Nierentransplantation durch die verfeinerten Möglichkeiten der Gefäßnaht gelöst ist, ist das Problem der Abstoßung

durch eine gezielte immunsuppressive Therapie eine Schwierigkeit, die in der Klinik noch verbessert werden muß.

In der Literatur wurde vielfach ein immunsuppressiver Effekt von ALS auf Haut (26)(46), Niere (38)(62), Herz (56), Leber (78) und in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen (10)(81) gezeigt, wie auch mit Erfolg bei Verbrennungen (28) eingesetzt.

Obwohl durch die Einführung des ALS in der Klinik als zusätzliches immunsuppressives Medikament zu Prednisone bzw. Azathioprine (77)(12)(69) eine Verbesserung der Immunsuppression erreicht werden konnte, hat man sich leider noch nicht auf eine einheitliche Dosierung festlegen können. So wird mit unterschiedlichen Dosierungen von low dose bis high dose Kombinationen und verschiedenen Zeitpunkten der Applikation von ALS wie auch von immunsuppressiven Medikamenten im allgemeinen therapiert (40).

Im Rahmen dieser Diskussion soll

1. auf das Problem der Dosierung von ALS und der optimalen Dosierung näher eingegangen werden, und

2. die Möglichkeit der Kombinationstherapie von ALS mit einer neuartigen immunsuppressiven Maßnahme, nämlich die Behandlung mit Vollblut und Spendererythrozyten diskutiert werden.

Für den besten therapeutischen Einsatz eines Medikamentes wie das ALS ist die Wirksamkeit des Pharmakons im unterschiedlichen Dosisbereich bedeutsam. Die Beziehung einer Dosis und der Wirkung einer Substanz können auf zwei Arten erfolgen, entweder wird die Abhängigkeit von einer Dosis durch die Häufigkeit an einem Kollektiv geprüft in Form einer Dosis-Reaktions-Beziehung (dose response relation), wobei die Zahl der Versuchsobjekte, die den erwarteten Effekt zeigt, zunimmt, oder die Wirkungsintensität eines Effektes wird an einem Versuchsobjekt in Form einer Dosis-Wirkungs-Beziehung (dose-effect

relation) bis zu seinem Maximum geprüft, wie in dieser Arbeit.

Unter der Voraussetzung, daß es sich bei den Versuchen um eine reversible Reaktion zwischen ALS und Rezeptoren handelt und der Vernachlässigbarkeit des unterschiedlichen Ansprechens der Rezeptoren bei geringer Dosierung, kann man folgende Überlegung aufstellen:

S (Wirkstoff) + R (Rezeptor) stehen mit unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten v_1 , v_2 mit dem Komplex S R im Gleichgewicht.

$$1) \quad S + R = \frac{v_1}{v_2} S R$$

Die normale Totalkonzentration der potentiell reagierenden Rezeptoren im Erfolgsorgan (R_t) minus der normalen Konzentration des S R Komplexes im Erfolgsorgan (S R) entspricht der normalen Konzentration der freien Rezeptoren im Erfolgsorgan (R).

$$2) \quad (R) = (R_t) - (S R)$$

Die normale Konzentration von ALS im Erfolgsorgan (S) entspricht der Dosis D zur Auslösung der Wirkung multipliziert mit einem Proportionalitätsfaktor c_1

$$3) \quad (S) = c_1 \cdot D$$

Die Wirkung W ist die von D ausgelöste reversible Wirkung und ist der Konzentration des S R Komplexes am Erfolgsorgan proportional.

$$4) \quad W = c_2 \cdot (S R)$$

Die erzielbare Maximalwirkung ist der Konzentration der potentiell reagierenden Rezeptoren proportional.

$$5) \quad W_m = c_2 \cdot (R_t)$$

Zur Ermittlung von (S R) in Gleichung 4) wird unter Verwendung des Massenwirkungsgesetzes auf Gleichung 1) (unter Verwendung von 2))

$$6) \quad 2) \text{ in } 1) \quad \frac{(S) \cdot (R_t) - (S R)}{(S R)} = K$$

K = Dissoziations-
konstante von

$$SR = \frac{v_2}{v_1}$$

aufgelöst nach (S R) =

$$(S R) \cdot K = (S) \cdot (R_t) - (S) \cdot (S R)$$

$$(S R) = \frac{(S) \cdot (R_t)}{K + (S)}$$

wegen 3) und 5)

$$W = W_m \cdot \frac{c_1 \cdot D}{K + c_1 D}$$

entsprechend einer hyperbolen Funktion in der
graphischen Darstellung.

Mit Hilfe dieser Formel läßt sich die in Abb.2 dargestellte Dosis-Wirkungskurve, welche mit Hilfe eines Tierexperimentes ermittelt wurde, rechnerisch bestätigen. So ist es möglich, mit der einmal ermittelten Konstanten K, z.B. Schnittpunkt der Kurve bei $1/2 W_m$ und entsprechender Dosierung, für jede ALS Dosis die Wirkung rechnerisch zu ermitteln.

Wie aus der graphischen Darstellung der Abb.2 zu ersehen ist, löst die einfache Dosis eine Reaktion aus, die ca. 15 % der Maximalwirkung entspricht.

Die doppelte Dosis wird nicht mit dem doppelten Wirkungsgrad von etwa 30 %, sondern mit ca. 60 % beantwortet. Diese Verdoppelung der Einzeldosis entspricht einer Addition der Wirkung auf der Dosis-Wirkungs-Kurve. Im aufsteigenden Schenkel ist der Zuwachs an Wirkung größer als bei linearer Abhängigkeit erwartet werden könnte. Folglich ist von einer Dosissteigerung bis zu einem gewissen Umfang ein deutlicher Wirkungsgewinn zu erzielen. Im oberen Teil der Kurve wird jedoch auch durch eine starke Dosissteigerung nur noch eine geringe Wirkungsverbesserung erreicht. So erzielt man mit einer Dosierung von 1 ml ALS eine Wirkung von ca. 80 %. Eine Steigerung um 100 % auf 2 ml ALS erbringt nur noch einen Gewinn von ca. 10 %.

Somit konnte durch die einmalige intravenöse Gabe von 1 ml ALS eine durchschnittliche Transplantat-

verlängerung von $12,40 \pm 0,24$ Tage auf $19,20 \pm 0,37$ Tage erzielt werden. Das entspricht 80 % der bei einmaliger Applikation von ALS erreichbaren Maximalwirkung.

Die Dosierung von 1 ml ALS = 50 mg Protein pro 250 g KG gilt in der Klinik als hoch dosierte Therapiemaßnahme.

Zumindest im Rattenmodell scheint Einigkeit in der Literatur vorzuliegen bezüglich der i.v. bzw. i.m. Applikationsart von ALS. Da die intramuskuläre Applikation stärkere Nebenwirkungen verursacht und ferner durch den fehlenden direkten Kontakt zur target-Zelle in der Wirkung wesentlich geringer ist, wird sie in den verschiedensten Tiermodellen praktisch nicht angewendet.

Auch die orale Applikation von ALS verlängert die Überlebenszeit von Hauttransplantaten bei Ratten. SEIFERT konnte zeigen, daß durch tägliche orale Gabe

von 1 ml ALS eine gegenüber unbehandelten Kontrolltieren doppelte Transplantatüberlebenszeit erreicht wird (72).

Ergebnisse von BERENBAUM et.al. (6) bei Mäusen zeigen, daß nach i.p. Applikation von ALS eine bessere Transplantatüberlebenszeit gefunden wird, die sogar durch s.c. Gabe noch gesteigert werden kann, als durch i.v. Gaben.

Untersuchungen von BERENBAUM (6) an Mäusen zeigen bei einmaliger i.p. Applikation ebenfalls die besten Ergebnisse, wenn das ALS einen Tag nach der Transplantation von Haut gegeben wird, gegeben zu den Zeitpunkten Tag +3 oder Tag +5 zeigten abnehmende mittlere Überlebenszeiten.

Lediglich bei mehrmaliger Applikation von ALS in niedriger Dosierung konnte ein noch besseres Ergebnis erreicht werden.

LEVEY und MEDAWAR (50) fanden ähnliche Ergebnisse. an Hauttransplantaten bei Mäusen. 1 ml ALS-Dosierungen an den Tagen +2, +5, +8 geben eine Transplantatverlängerung von durchschnittlich 11,6 Tagen auf 16,5 Tage, 13,5 Tage und 14,5 Tage.

Bei einer Aufteilung auf 2 Dosierungen von 0,5 ml ALS gegeben an den Tagen +2 und +5 wurde eine Verlängerung auf 20,5 Tage beobachtet, was signifikant länger war als bei einer einmaligen Dosis von 1 ml. Eine weitere Unterteilung auf 0,25 ml ALS gegeben an den Tagen +2, +4, +6, +8 war mit 16,5 Tagen weniger effektiv.

Auf Grund dieser Ergebnisse tauchen 2 Fragen auf: Warum ist die Wirkung von ALS kurz nach der Transplantation am größten, und aus welchem Grund ist bei mehrmaliger Applikation die Wirkung im mittleren Dosisbereich von ca. 0,5 ml besser?

Zur Klärung dieser Frage hilft der Wirkungsmechanismus von ALS.

Dabei handelt es sich um ein artfremdes Protein (1) (12), das durch seine antilymphozytäre Komponente sowohl nach parenteraler wie auch enteraler (72) Applikation im peripheren Blut bei Menschen (77) und Tieren (69) eine Lymphopenie verursacht (25)(35).

Weitestgehende Einigkeit herrscht in der Ansicht, daß vorwiegend zirkulierende Lymphozyten dem Angriff durch das ALS ausgesetzt sind (9), also hauptsächlich thymusabhängige T-Zellen (69).

Weitere Theorien sprechen von

- 1) Antigen-Konkurrenz: ALS als starkes Antigen, wodurch das lymphoide System auf ein weiteres Antigen schwächer reagiert
- 2) Verblendung (blindfolding): Mittels Immunofluoreszenz konnte gezeigt werden, daß sich ALS in vivo an Lymphozyten anlagert und diese überzieht. Dadurch wäre ihnen die Möglichkeit der Antigenerkennung genommen. (ALS-Fragmente lagern sich jedoch auch an, ohne Wirkung zu zeigen) (51)

- 3) Sterile Aktivierung: beruht auf der Beobachtung, daß ALS mitogene Eigenschaften hat und in vitro kultivierte Lymphozyten zu Lymphoblasten transformiert. Ebenso könnte ALS ähnlich wie Phytohämagglutinin zu einer unspezifischen Aktivierung der Lymphozyten führen (52).
- 4) Opsonierung: unter Komplementbeteiligung soll durch ALS die Lymphozytenoberfläche so verändert werden, daß es durch das reticuloendotheliale System zu einer Elimination von immunologisch kompetenten Lymphozyten kommt.
- 5) Weiter seien erwähnt: Hemmung der humoralen Antwort, Hemmung von Thymusfaktoren, Hemmung der Lymphozytenpermeabilität, Hemmung von Komplement, und Anstieg des Plasma-Cortisol Spiegels.

Wenn also ALS vorwiegend auf die peripher zirkulierenden Lymphozyten wirkt, ist die Wirkung abhängig von der Konzentration und der Dauer, in der die Konzentration aufrecht erhalten wird.

BERENBAUM untersuchte das Verhältnis abnehmender und zunehmender Zellpopulationen bei verschiedenen Dosierungen von ALS in Abhängigkeit zur Zeit. Dabei geht er einmal vom exponentiellen Wachstum von Zellpopulationen aus, die durch die Applikation von ALS zu einem Bruchteil der ursprünglichen Zellpopulation reduziert werden, um dann in einer Zeit t erneut exponentiell anzusteigen.

BERENBAUM ermittelte dabei einen Formelkomplex, der den Einfluß mehrmaliger ALS-Applikation auf die Höhe der tatsächlichen Zellpopulation zum Zeitpunkt t ermitteln läßt (6).

Die erhaltene Dosis-Reaktions-Beziehung zeigt, daß die optimale Dosierung eine tägliche Gabe aus dem Produkt der Schwellendosis D_q und dem natürlichen Logarithmus $e = 2,7$ ist, beobachtet auf einen Zeitraum von 16 Tagen.

Damit wären die Ergebnisse bei mehrmaliger Applikation von ALS von LEVEY und MEDAWAR (50) und die von BERENBAUM (6) erklärbar, wonach die optimale Dosie-

rung zumindest bei mehrmaliger Applikation im mittleren Dosisbereich liegen.

Unter der Voraussetzung, daß ALS zumindest in den ersten Tagen nach Applikation exponentiell abgebaut wird, ist durch die Änderung der Konzentration pro Zeit eine direkte Proportionalität der Wirkung zur Anfangskonzentration festzustellen. Dies gilt jedoch nur bei einer einmaligen Dosierung, also einer möglichst hohen, aber noch praktikablen ALS Dosis.

Bei mehrmaliger Anwendung von ALS ist die Tatsache bedeutsam, daß die Zeit für eine exponentiell abbauende Konzentration proportional dem Logarithmus der Dosis ist und somit kleine gleichstarke Dosierungen besser sind als hohe, mit zum Erreichen der nötigen Konzentrationsschwelle inkonstanten Dosierungen.

Die in der ALS Anwendung auftretenden Nebenwirkungen (14) (49) (68) (15) können durch die Senkung der Toxizität von ALS durch die Herstellung mög-

lichst reiner Seren erreicht werden (70), wobei die bei höheren Dosierungen von ALS auftretenden toxischen Erscheinungen, wie in dieser Arbeit beschrieben wird, nicht durch die Gabe von Kortikosteroiden gesenkt werden können, siehe Tab.9.

Die immunologische Antwort auf das artfremde Eiweiß kann durch zusätzliche immunsuppressive Medikamente, besonders ideal aber erst durch die Erzeugung einer Immuntoleranz, gering gehalten werden.

Die immunologische Toleranz, als ein Zustand von fehlender oder verminderter Reaktionslosigkeit gegenüber einem Fremdantigen, das normalerweise eine Immunreaktion auslöst, kann einmal als ein zentraler Effekt auf Lymphozyten aufgefaßt werden, wobei die Wechselwirkung von Antigen bzw. Antigen-antikörper mit spezifischen Rezeptoren auf immunologisch kompetente B- oder T-Zellen mit Elimination oder Paralyse wirkt, zum anderen als ein peripherer Mechanismus mit Antigen induzierter spez. Reaktionslosigkeit im Sinne von Enhancement, wobei Antikörper

das Antigen vor Kontakt mit spez. Rezeptoren auf immunkompetente Lymphozyten schützen (22). Während die Erzeugung einer Toleranz bei neugeborenen Tieren relativ leicht zu erzielen ist (2), da das noch nicht voll ausgebildete Immunsystem noch nicht in der Lage ist, auf ein Antigen mit Antikörpern zu reagieren, ist bei erwachsenen Tieren nur unter bestimmten Voraussetzungen eine Toleranzinduktion zu erzielen (30) (31).

So ist es möglich, eine Toleranz durch sehr niedrige Antigendosen zu erzielen. Voraussetzung ist ein lösliches Antigen, das nicht verunreinigt ist und das z.B. durch Zentrifugieren und Ultrazentrifugieren erreicht werden kann. So kann Toleranz für HGG (29), BSA (60) (32), Pferde GGL (48) erzielt werden. Aber auch mit sehr großen Antigenmengen kann eine Toleranz erzielt werden, z.B. gegen BSA (60).

Für aktives Enhancement wurden verschiedene Typen von spenderspezifischen Antigenen verwendet, lebende Zellen (61), wie auch halblösliche Antigene (44) (80) (17). Da die Antigenvorbehandlung unterschied-

lich war, untersuchte LIE (54) den Einfluß der Reinheit des Antigens auf die Überlebensdauer des Organempfängers und fand heraus, daß die lebenden Zellen am effektivsten waren. Doch kann es bei deren Anwendung gelegentlich zu GvH-Reaktionen kommen, da lebende immunkompetente Zellen nach MEDAWAR (58) in der Lage sind, Antikörper zu bilden oder zytotoxisch zu reagieren.

Speziell wurde die Verlängerung von Organtransplantzeiten durch Vorbehandlung mit spenderspezifischen Antigenen wie mit Spenderblut (39) bei Hunden, Milzzellen (38), ohne und mit ALS (16), Knochenmarkzellen (61) usw. durchgeführt.

Der enge Zusammenhang zwischen Abstoßungsrisiko und der präoperativen Gabe von Bluttransfusionen wurde erstmals durch OPELZ et.al. 1973/74 aufgezeigt (64).

Ergebnisse von OPELZ (63) und OLIVER (62) demonstrieren eine signifikante Beziehung zwischen Nierentransplantatüberlebenszeiten und der Abwesenheit von zyto-

toxischen Antikörpern im Serum von Empfängern mit einer langen Bluttransfusionsanamnese. (FERRARA konnte dies im Versuch bestätigen (34).) Sie fanden heraus, daß Patienten, die keine Bluttransfusionen bekommen hatten oder die mit leukozyten-armem Blut transfundiert wurden, auffallend geringe Überlebenszeiten von verpflanzten Nieren hatten, verglichen mit Patienten, die mit Vollblut transfundiert wurden. Dabei wurde vermutet, daß Bluttransfusionen einen gewissen Grad von spez. immunologischer Unempfänglichkeit induzieren und daß dieser Effekt in der Transplantationsimmunität ausgenutzt werden könnte. (38).

Versuche von BALNER und Mitarbeitern mit Rhesusaffen, die fünf Bluttransfusionen vor der Nierentransplantation erhielten, erzielten eine vierfache mittlere Transplantatüberlebenszeit verglichen mit unbehandelten Empfängertieren (5). HALASZ und ORLOFF zeigten ebenfalls eine starke Transplantatverlängerungszeit von 9 auf 29 Tage

durch subcutane Vorimmunisierung von Vollblut bei Hunden mit Nierentransplantaten (39).

In Tierversuchen, hauptsächlich an Ratten, wurde versucht, durch Vorbehandlung mit Blut bei Herztransplantaten mit unterschiedlichen Zeitintervallen und Dosierungen einen Effekt zu erzielen. Eine Vorbehandlung mit einer einzigen i.v. Gabe von 1 ml Blut ergab aber ohne einer Zusatztherapie eine Verminderung der Wirkung auf nur 5 Tage, bei 8 bis 9 Tagen von unbehandelten Kontrolltieren (57) (56).

Andererseits wurde durch die Vorbehandlung mit Spenderblut kombiniert mit einer einzigen Injektion von 50 mg Cyclophosphamid/kg KG beobachtet, daß die Sensibilisierung verhütet werden und sogar in eine dauernde Akzeptierung übergeführt werden konnte (56).

Wie aus der Abbildung 4 zu ersehen ist, zeigen die Versuche in dieser Arbeit bei Vorbehandlung der Empfängertiere mit Vollblut und einem Adjuvans

eine gegenüber unbehandelten Kontrolltieren nur mäßige Verlängerung von Hauttransplantaten um durchschnittlich 1 Tag. Da einige Adjuvantien wie Freund-sches Adjuvans (74) aber auch der in diesem Versuch verwendete "Serum-Aktivator" (73) per se einen immunsuppressiven Effekt haben, dürfte die geringe Transplantatverlängerungszeit auf das Adjuvans und nicht auf die Sensibilisierung mit Vollblut zurückzuführen sein.

Bei der zusätzlichen Gabe von 1 ml ALS bei gleichen Versuchsbedingungen wurde sogar eine geringe Verkürzung der Überlebenszeit von Hauttransplantaten erzielt.

Es ist also wie bei dem schon erwähnten Versuch der Vollblutvorbehandlung (56) bei Herztransplantaten im Rattenmodell auch hier keine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit zu erzielen gewesen. Auch nicht durch die zusätzliche Gabe von ALS, womit durch die Vorbehandlung gebildete sensibilisierte Lymphozyten eliminiert werden sollten.

Da bei der Vorbehandlung mit Vollblut nach den Untersuchungen von BACH sowohl LD als auch SD Antikörper gebildet werden, wurde wahrscheinlich eine vollständige Immunreaktion ausgelöst, denn dafür sind sowohl LD als auch SD Antikörper (3) notwendig.

Die gleiche Untersuchergruppe konnte zeigen, daß durch Vorbehandlung mit gewaschenen Erythrozyten, auf denen nur die SD Komponente sitzt, eine inkomplette Immunantwort ausgelöst wird, die darin besteht, daß nur schützende oder blockierende Antikörper gebildet werden.

Die geringe Überlebenszeit durch die Vorbehandlung von Vollblut und Adj. und anschließender ALS-Applikation ist durch die stärkere Erhöhung des SD und LD Antikörperlevels und somit erhöhten zytotoxischen Anteils erklärbar, vor allem, wenn man sie mit unbehandelten Kontrolltieren, wie ALS-behandelten Tieren vergleicht.

Nachdem durch die Vorbehandlung mit Vollblut keine Wirkungsverbesserung von ALS zu erzielen war, sondern eher eine Abschwächung der Wirkung, sollte in weiteren Versuchen durch die Antigenvorbehandlung mit Erythrozyten eine immunologische Toleranz wenigstens zeitweise erzielt werden, um die ALS-Wirkung zu verbessern.

Dabei ist von Bedeutung, zu welchem Zeitpunkt das Antigen gegeben wird und in welcher Konzentration bzw. Dosierung es appliziert wird.

In der Literatur sind von verschiedenen Untersuchern unterschiedliche Zeitspannen der Antigenbehandlung bis zur Transplantation gewählt worden.

KIM (44) injizierte Milzzellen 1 Tag vor Nierentransplantationen bei Ratten, und LIE (55) wählte für den Zeitraum der Antigenvorbehandlung 15, 8 und 1 Tage.

Mit Hauttransplantaten behandelte BRENT und KILSHAW (16) Mäuse 16 Tage vorher mit Milzzellen. Dabei muß beachtet werden, daß unter identischen genetischen Bedingungen und ohne Immunsuppression Haut schneller abgestoßen wird als Nierentransplantate (84).

In dieser Arbeit wurde bei einer Antigenvorbehandlung von 10 Tagen vor der Transplantation eine Verlängerung der Transplantatüberlebenszeit von durchschnittlich 14,40 Tagen bei unbehandelten Kontrolltieren auf 19,40 Tagen erreicht. Dieses Ergebnis wurde mit einer Dosierung von 10^8 Erythrozyten erreicht, eine Konzentration, mit der auch OCKNER (61) eine deutliche Immunsuppression erreichte.

Untersuchungen von FINGER (35) zeigen, daß im Mäuseexperiment bei einer immunogenen Schwellendosis von 10^6 Schafererythrozyten auf cellulärer und humoraler Ebene eine gerade noch meßbare Immunitätsreaktion auftritt. Dabei waren nur 0,8 % der 19 S und 7 S Hämolysin bildenden Milzzellen nachweisbar, die

nach der Erstimmunisierung mit einer gesättigten Antigendosis von 10^8 Schafererythrozyten gefunden wurden.

Durch die Applikation von 10^8 Erythrozyten konnte somit neben der deutlichen Transplantatverlängerung bei alleiniger Erythrozytenvorbehandlung durch die zusätzliche Gabe von ALS eine nochmalige Verlängerung der Überlebenszeit von Hauttransplantaten bei Ratten erzielt werden. (s.Tab.11)

Als mögliche Erklärung könnte die zusätzliche Zerstörung von transplantatschädigenden LD Antikörpern durch ALS zu dem Erfolg geführt haben.

Die in Tab. 13 nachzuweisenden niedrigeren Hämagglutinationstitern in den mit Erythrozyten vorbehandelten Versuchsgruppen könnten die Vermutung einer Bildung von schützenden oder blockierenden Antikörpern unterstreichen.

Jedoch mußte im Rahmen dieser Arbeit auf eine nähere Untersuchung und Bestimmung der Spezifität verzichtet werden.

Die gebildeten blockierenden oder schützenden Antikörper könnten nach SJÖGREN (76) Immunglobuline vom Typ der IgG_1 sein, die im Gegensatz zu den IgG_2 die antigenspezifischen Determinanten besitzen, sie aber nicht lysieren. Nach VOISIN (83) kämen neben den nicht komplement bindenden IgG_1 möglicherweise auch IgA in Frage. Erkenntnisse, nach denen enhancing Antikörper 1 bis 7 Tage nach Antigengebe im Serum erscheinen, könnten nach DESI (27) zu der Vermutung Anlaß geben, daß frühe Immunglobuline besonders 19 S zu der Verlängerung von Organtransplantationen führen.

EICHMANN (33) stellt die Hypothese auf, nach der IgG Subklassen auch eine Funktion als Antiidiotypische Antikörper erfüllen, als gegen die Antigenbindungsstellen von Antikörpern monoklonalen Ursprungs, der "Idiotypen" gerichtet. Als IgG_1 vom

Meerschweinchen haben sie eine stimulierende Wirkung auf Lymphozyten, als IgG₂ eine supprimierende Wirkung.

Suppressor T-Zellen könnten so durch Antiidiotypische Antikörper induziert werden, und den idiotypischen B-Zell Klon supprimieren (37) (18).

BINZ und WIGZELL (8) erreichten so in mehreren Versuchen durch die Bildung von Auto-Anti-idiotypischen Antikörpern Transplantatverlängerungen, und KILSHAW (43) führt seine Transplantaterfolge bei Antigenvorbehandlung auf die Funktion von Suppressor T-Zellen zurück.

Für die klinische Anwendung in der Organtransplantation wäre es ein Riesenerfolg, wenn es gelänge, diese vermeintlichen enhancing Antikörper endgültig zu erkennen und die genauen Bedingungen, die zu ihrer Produktion führen, nachzuvollziehen.

In der Klinik werden momentan durch die Vorbehandlung mit Erythrozytenkonzentrate ca. 6 Wochen vor einer geplanten Nierentransplantation gute Ergebnisse erzielt. Nach einer Eurotransplant-Studie liegt der Anteil der nach einem Jahr noch funktionierenden Nierentransplantate ohne vorausgegangenen Bluttransfusionen bei nur 18 % gegenüber mit Bluttransfusionen behandelten Patienten bei 70 % (67)

Der spezifische Allo-Antikörper ist ein perfektes immunsuppressives Mittel, der weder toxisch ist noch beim Empfänger zu biologischen Unverträglichkeitsreaktionen führt und nur ganz spezifisch in die Immunantwort eingreift. Darüber hinaus läßt sich dieser Effekt gut mit dem transplantatverlängernden Effekt von ALS kombinieren.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung von Antilymphozytenserum bei Rattenhauttransplantaten erstellt. Dabei zeigte sich in der graphischen Darstellung eine hyperbole Funktion, die sich rechnerisch bestätigte. Es wurde deutlich, daß bei einer Dosierung von 1 ml ALS entsprechend 50 mg Protein pro 250 g KG eine Wirkung von 80 % der Maximalwirkung erreicht wird und durch eine weitere Dosissteigerung nur noch eine geringe Wirkungsverbesserung erzielt werden kann. Die Mortalitätsrate bei noch höheren ALS-Dosierungen konnte durch die zusätzliche Applikation von Kortikosteroiden nicht gesenkt werden.

Die Vorbehandlung mit Erythrozyten 10 Tage vor der Hauttransplantation zeigte eine deutliche Transplantatverlängerung von 14,4 Tage auf 19,4 Tage, die durch die zusätzliche Applikation von 1 ml ALS 1 Tag nach der Transplantation noch auf 22,8 Tage verbessert werden konnte.

Eine Vorbehandlung mit Vollblut zeigte keine Transplantatverlängerung.

Als Hinweis dafür, daß die Ergebnisse der Erythrozytenvorbehandlung möglicherweise als aktives Enhancement zu interpretieren sind, dienen die Nichtreproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Umkehr des Spender-Empfängersystems sowie die geringere hämagglutinierende Antikörperbildung bei den mit Erythrozyten vorbehandelten Tieren.

Als Schlußfolgerung für die klinische Anwendung bietet sich der Gebrauch von Erythrozytenkonzentraten vor einer Transplantation in Verbindung mit ALS an. Dabei bleibt zu prüfen, ob durch eine geeignete Dosierung und durch einen optimal gewählten Zeitpunkt der Vorbehandlung eine Wirkungsverbesserung zu erzielen ist.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. AGNEW, H.D. The effect of heterologous antilymphocytic serum on the small lymphocyte population of rats.
J. exp. Med. 217, 111 (1968)
2. ARGYRIS, B.F. Transplantation of adult peritoneal cells into new-born mice.
Transplantation 8, 241 (1969)
3. BACH, F.H.
 BACH, M.L. Extrapolation of in vitro models of allograft immunity to tumor immunity.
Biotest Mitt. 34, 13 (1974)
4. BAETHMANN, A.
 STRUCKMEYER, A.
 KIFFNER, E. and
 W.BRENDEL ALS in predamaged organisms
Biotest Mitt. 34, 20 (1974)
5. BAINER et.al. Blood transfusions induce prolonged kidney allograft survival in rhesus monkeys
12th Congress of Europ.Soc. f. Surgical Research, 1977, Poland
6. BERENBAUM, M.C.
 BRENT, L. and
 P.J.KILSHAW The therapeutic significance of the dose response curve for antilymphocytic serum
Transplantation 12, 18 (1971)

7. BILLINGHAM, R.E.
BRENT, L.
MEDAWAR, P.B. Actively acquired tolerance
of foreign cells
Nature, 172, 603 (1953)
8. BINZ, H.
WIGZELL, H. Specific transplantation
tolerance induced by auto-
immunization against the
individuals own, naturally
occurring idiotypic, antigen-
binding receptors
J.exper.med. 144, 1438 (1976)
9. BRENDDEL, W.
LAND, W. Grundlagen der Therapie mit
Antilymphozytenglobulin
aus "Autoimmunerkrankungen"
Stuttgart, New-York
Schattauer (1969)
10. BRENDDEL, W.
SEIFERT, J.
LOB, G.
ANGSTWURM, H.
FRICK, E.
BRASS, B.
MERTIN, J. and
BACKMUND, H. The treatment of autoimmune
diseases with ALG
Behring Inst.Res.Communications
51, 176 (1972)
11. BRENDDEL, W. und
PICHLMAYR, R. Heterologe Antilymphozytenserum
zur Immunsuppression bei Organ-
transplantationen
Dtsch.Med.Wschr. 92, 549 (1967)
12. BRENDDEL, W.
LAND, W. Überraschende Ergebnisse durch
intravenöse Therapie mit Anti-
lymphozytenserum bei Organtrans-
plantationen
DMW 48, 2309 (1968)

13. BRENDEL, W. Essential improvements in immuno-
 suppression by high intravenous
 doses of antilymphocyte globulin
 Europ.Soc.Exp.Surg. 4th congress
 1969
14. BRENDEL, W. The clinical use of ALG
 Transpl.Proc. 1, 280 (1971)
15. BRENDEL, W. Intravenous use of high dosage
 of ALG
 Laval Médical 41, 255 (1970)
16. BRENT, L. Prolongation of skin allograft
 KILSHAW, P.J. survival with spleen extracts
 and antilymphocytic serum
 Nature, 227, 898 (1970)
17. BRENT, L. Unresponsiveness to skin allo-
 HANSEN, J.A. graft induced by tissue extracts
 KILSHAW, P.J. and antilymphocytic serum
 Transpl.proc. 3, 684 (1971)
18. BRENT, L. Specific unresponsiveness to
 OPARA, S.C. skin allografts in mice
 Transplantation 27, 120 (1979)
19. BRENT, L. Transplantation tolerance
 BROOKS, C.G. Reit.Med.Bulletin 32, 101 (1976)
20. BRENT, L. Specific unresponsiveness
 BATCHELOR, J.R. Transpl.Proc. 9, 1 (1977)

29. DIETRICH, F.M. Immunologic unresponsiveness
WEIGLE, W.C. to heterologous serum proteins
 induced in adult mice and trans-
 fer of the unresponsive state
 J.Immunol. 92, 167 (1964)
30. DRESSER, D.W. and Immunological paralysis induced
GOWLAND, D. in adult rabbits by small amounts
 of a protein antigen
 Nature (Lond) 203, 733 (1964)
31. DRESSER, D.W. Specific inhibition of anti-
 body production. II. Paralysis
 induced in adult mice by small
 quantities of protein antigen
 Immunology 5, 378 (1962)
32. DRESSER, D.W. and The mechanism of immunological
MITCHISON, N.A. paralysis
 Adv.Immunol. 8, 129.(1968)
33. EICHMANN, K. Idiotypic suppression. I.Influence
 of the dose and the effector
 functions of antiidiotypic anti-
 body on the production of an
 idiotypic
 Eur.J.Immunol. 4, 296 (1974)
34. FERRARA, G.B. HLA unresponsiveness induced by
TOSI, R.M. weekly transfusion of small
AZZOLINA, G. aliquots of whole blood
CARMINATI, G. Transplantation 17, 194 (1974)
LONGO, A.

35. FINGER, H. 19 S- und 7 S-Gedächtnis der
EMMERLING, P. Maus nach Erstimmunisierung
OFFENHAMMER, A. mit einer immunogenen Schwel-
lendosis von Schaferythrozyten
Z.med.Mikrobiol.u.Immunol. 155,
203 (1970)
36. FLAD, H.D. Die klinische Bedeutung der
Lymphozytenpopulationen
Med.Kli. 74, 1199 (1979)
37. GERSHON, R.K. Cell interactions in the induc-
KONDO, K. tion of tolerance. The role of
thymic lymphocytes
Immunology 18, 723 (1970)
38. GUTTMANN, R.D. Renal transplantation in the
LINDQUIST, R.R. inbred rat
OCKNER, S.A. Transplantation 8, 837 (1969)
39. HALASZ, N.A. Increased survival of renal
ORLOFF, M.J. homografts in dogs after injec-
HIROSE, F. tion of graft donor blood
Transplantation 2, 453 (1964)
40. HOWARD, R.J. The effect of serum ALG concen-
CONDIE, R.M. trations on results following
SUTHERLAND, D.E.R. renal transplantation
SIMMONS, R.L. Ann.Surg. 186, 619 (1977)
NAJARIAN, J.S.
41. HUMPHREY, J.H. Kurzes Lehrbuch der Immunologie
WHITE, R.G. Stuttgart: Thieme 1971

42. JABOULAY, M. Greffe de reins au pli du coude
par soudures arterielles et
veneuses
Lyon med. 107, 575 (1906)
43. KILSHAW, P.J. Suppressor T cells in mice made
BRENT, L. unresponsive to skin allografts
PINTO, M. Nature, 255, 489 (1975)
44. KIM, J.P. Active enhancement of rat renal
SHAIPANICH, T. allografts with soluble splenic
SELLS, R.A. antigen
MAGGS, P. Transplantation 13, 322 (1972)
LUKL, P.
WILSON, R.E.
45. KINCADE, D.W. Development and distribution of
COOPER, M.D. immunglobulin - containing cells
in the chicken
J.Immunology, 106, 371 (1971)
46. LANCE, E.M. Survival of skin heterografts
MEDAWAR, P.B. under treatment with antilympho-
cyte serum
Lancet I, 1174 (1968)
47. LANCE, E.M. and Antigenicity in mice of anti-
DRESSER, D.W. lymphocyte gamma globulin
Nature 215, 488 (1967)
48. LAND, W. Immunological tolerance induced
SEIFERT, J. in adult dogs by small amounts
FATEH-MOGHADAM, A. of horse IgG
HOPF, U. Transplantation 8: 748 (1969)
BRENDDEL, W.

49. LAND, W.
BRENDDEL, W. Einige Aspekte zur Therapie mit
Antilymphozytenglobulin
Therapiewoche 21, 534 (1971)
50. LEVEY, R.H.
MEDAWAR, P.B. Some aspects of the action of
antilymphoid antisera
Proc.nat.Acad.Sci. 56, 1130 (1966)
51. LEVEY, R.H.
MEDAWAR, P.B. Nature and mode of action of
antilymphocytic serum
Proc.Acad.Sci.Wash. 56, 1130
(1966)
52. LEVEY, R.H.
MEDAWAR, P.B. Further experiments on the
action of antilymphocytic sera
Proc.Acad.Sci.Wash. 58, 470
(1967)
53. LEXER, E. Arch.klin.Chir. 95, 827 (1911)
54. LIE, T.S.
EBATA, H.
HOLST, A.
NAKANO, H.
KIN, Y.Z. Der Effekt der spenderspezifischen
Antigen-Typen auf aktives
Enhancement der Rattennieren-
allotransplantate bei histoin-
kompatiblen Inzucht-Ratten
Res.exp.Med. 165, 175 (1975)
55. LIE, T.S.
EBATA, H.
KIM, W.I.
GRÜNN, U. Active enhancement of rat
kidney allografts
Transplantation 21, 103 (1976)
56. MARQUET, R.L.
HEYSTEK, G.A. The effect of antidonor serum
and antigen-antibody complexes
on the survival of heart allo-
grafts in rats presensitized
with donor blood
Transplantation 23, 119 (1977)

57. MARQUET, R.L.
VAN BEKKUM, D.W. The reactivity of blood lymphocytes from actively enhanced rats
Transpl.Proc. 5, 631 (1973)
58. MEDAWAR, P.B. The use of antigenic tissue extracts to weaken the immunological reaction against skin homografts in mice
Transplantation 1, 21 (1963)
59. METCHNIKOFF, E. Etudes sur la resorption des cellules
Ann.Inst.Pasteur (Paris) 13, 737 (1899)
60. MITCHINSON, N.A. Induction of immunological paralysis in two zones of dosage
Proc.Roy.Soc.B 161, 275 (1964)
61. OCKNER, S.A.
GUTTMANN, R.D.
LINDQUIST, R. Renal transplantation in the inbred rat. XIII. Modification of reaction by active immunization with bone marrow cells
Transplantation 9, 30 (1970)
62. OLIVER, R.T.D.
SACHS, J.A.
FESTENSTEIN, H. A collaborative scheme for tissue typing and matching in renal transplantation
VI. Clinical relevance of HL-A matching in 349 cadaver renal transplants
Transpl.Proc. 5, 245 (1973)

70. PICHLMAYR, R. Experimentelle Untersuchungen
LAND, W. zur Verbesserung der Spezifi-
WAGNER, E. tät von Antilymphozytenseren
WEIFERT, J. und ihre Verträglichkeit
FATEH-MOGHADAM, A. Klin.Wschr. 47, 625 (1969)
EULITZ, M.
BRENDDEL, W.
71. SCHÖNE, G. Die heteroplastische und homöo-
plastische Transplantation
Berlin: Springer (1912)
72. SEIFERT, J. Enterale Resorption großmole-
kularer Proteine bei erwachse-
nen Tieren und Menschen
Habilitationsschrift Münch. (1974)
73. SEIFERT, J. Der Einfluß einer Sensibilisie-
SCHNACKENBURG, O. rung mit Antihautantikörper auf
BRENDDEL, W. die Transplantatüberlebenszeit
von allogener Rattenhaut
Tagesbericht der 22. Jahresta-
gung der Gesellschaft zur Er-
forschung der makromolekularen
Organo- und Immunotherapie
Stuttgart 1976
74. SEIFERT, J. Die Transplantatüberlebenszeit
AGYARE-YEBOAH, F. homologer Rattenhaut nach gleich-
BRENDDEL, W. zeitiger Applikation von ALG und
Freundschem Adjuvans
Langenbecks Arch.Chir.Suppl.
Chirurg.Forum 199, (1973)
75. SEIFERT, J. Prolongation of skin allografts
RING, J. after oral application of ALS
BRENDDEL, W. in rats
Nature, 249, 776 (1974)

76. SJÖGREN, H.O.
HELLSTRÖM, J.
BANSAL, S.C.
HELLSTRÖM, K.E. Suggestive evidence that the
"blocking" antibodies of tumor
bearing individuals may be anti-
gen-antibody-complexes
Proc.nat.Acad.Sci. 69, 2696 (1972)
77. STARZL, T.E.
BRETTSCHEIDER, L.
PENN, I. A trial with heterologous anti-
lymphocyte globulin in man
Transplant.Proc. 1, 448 (1969)
78. STARZL, T.E.
MARCHIORO, T.L.
PORTER, K.A.
IWASAKI, Y.
CERILLI, G.J. The use of heterologous anti-
lymphocyte agents in canine-
renal- and liver-homotransplan-
tation and in human renal homo-
transplantation
Gyn.Obstet. 124, 301 (1967)
79. STUART, F.P.
FITCH, F.W.
ROWLEY, D.A. Presence of both cell - mediated
immunity and serum - blocking
factors in rat renal allografts
"enhanced" by passive immuni-
zation
Transplantation 12, 331 (1971)
80. SUMERSKA, T.
BETEL, I.
BALNER, H. and
HILARY S.WARREN Prolongation of skin allograft
survival with antilymphocyte
serum and soluble histocompati-
bility antigens
Transplantation 17, 1 (1974)
81. TREPEL, F.
PICHLMAYR, R.
KIMURA, I.
BRENDEL, W. and
BEGEMANN, H. Therapieversuche mit Antilympho-
zytenserum bei Autoaggressions-
krankheiten des Menschen
Klin.Wschr. 46, 856 (1968)

82. ULLMANN, E. Experimentelle Nierentrans-
plantation
Wien.klin.Wschr. 15, 281, (1902)
83. VOISIN, G.A. Biological properties of anti-
KINSKY, R. body classes in transplantation
JANSEN, F. immune sera
BERNARD, C. Transplantation 8, 618 (1969)
84. WHITE, E. and Allografts in genetically defined
HILDEMAN, W.H. rats: Difference between kidney
and skin
Science 162, 1293 (1968)
85. WOODRUFF, M.F.A. The effect of lymphocyte deple-
and ANDERSON, N.F. tion by thoracic duct fistula
and administration of antilympho-
cytic serum on the survival of
skin homograft in rats
Ann.N.Y.Acad.Sci. 120, 119 (1964)

Herrn Prof. Dr. Dr. W. Brendel danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes am Institut für Chirurgische Forschung der Universität München und für seine Ratschläge im Verlauf der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Seifert für die Einführung in das experimentelle Arbeiten sowie für Rat und Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit.

LEBENS LAUF

Geboren am 9.8.1948 in Mittelberg, Klein-Walsertal, als Sohn meiner Eltern Helmut Schnackenburg und Illa Schnackenburg, geb. Swart.

Ab 1954 Besuch der Volksschulen in Oberstdorf, Wuppertal, Göttingen und Kaufbeuren; ab 1962 Besuch der Oberrealschule Kaufbeuren, ab 1964 Realschule Immenstadt, ab 1966 math.nat.wiss. Gymnasium Oberstdorf, dort Reifeprüfung 1970.

Ab Herbst 1970 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München, ab Frühjahr 1973 Studium der Medizin an der LMU München, Vorphysikum Herbst 1973, Physikum Frühjahr 1975; 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Frühjahr 1977; 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Frühjahr 1978.

Praktisches Jahr: Chirurgie im Kreiskrankenhaus Starnberg vom 17.4.78 bis 6.8.78; Gynäkologie im Kreiskrankenhaus Starnberg vom 15.8.78 bis 1.12.78; Innere Medizin in der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München vom 1.12.78 bis 25.3.79. 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung 25.4.79; Approbation 23. Mai 1979. Seit Sept. 1979 Assistenzarzt an der Chirurgischen Klinik der Universität München bei Prof. Dr. Heberer.

